

論文内容の要旨

論文提出者氏名 片村 真紀

論文題目

Curcumin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inducing autophagy via the regulation of JNK phosphorylation

論文内容の要旨

心筋細胞は終末分化細胞であるためその細胞死は心不全に直結し、細胞死の回避は心不全発症予防に非常に重要である。アントラサイクリン系抗癌剤のドキソルビシン（以下 DOX）は心筋障害の副作用が知られ、投与後慢性期にしばしば心機能低下が観察される。その発症機序は活性酸素種(ROS)の産生とその結果生じるアポトーシスとネクローシスによる心筋細胞死が中心と言われているが、近年オートファジーの関与も報告されている。オートファジーは全ての真核生物に保存された細胞内分解系で、細胞内異常タンパクや不要な細胞内小器官を排除してタンパク質のリサイクルを行い、生体の恒常性維持に寄与する。飢餓状態では細胞内タンパク質を分解してアミノ酸供給を行う。オートファジーとアポトーシスはそれぞれ独立した細胞内プロセスであるが相互に関連があり、病的ストレス下の心不全発症ではオートファジーの心保護的な機能も知られている。しかし DOX 心筋障害におけるオートファジーの役割は現在まで明らかではない。本研究では天然物質のクルクミン（以下 Cur）を用いて DOX 心筋障害に対し保護効果を示すか、その機序にオートファジーが関与するか、シグナル伝達経路とともに検討を行った。

まず雄 8 週齢マウスを DOX 群、DOX + Cur 群に分け、DOX は 20mg/kg を腹腔内単回投与し、DOX 投与の 5 日前から Cur 1mg/kg/day を 4 週間連日腹腔内投与した。DOX 群には vehicle である PBS+1%DMSO を同様に連日腹腔内投与した。DOX 群マウスの生存率は 4 週間で 40%にまで低下したが、DOX + Cur 群では 84%に保たれ劇的な死亡率減少効果が見られた。心エコー図検査の結果 DOX 群では 4 週間で著しい心機能低下、心室壁菲薄化を認めたが、DOX + Cur 群では心機能も壁厚も維持されていた。DOX 群の心筋病理組織は心筋細胞の萎縮と心筋配列の乱れや繊維化を示したが、DOX + Cur 群では配列は維持され繊維化も抑制された。心筋組織の TUNEL 染色の結果 DOX 群では TUNEL 陽性細胞数の増加を認めたが、DOX + Cur 群では増加が抑制されアポトーシスが減少した。免疫染色ではアポトーシス初期に検出される cleaved PARP 陽性核が DOX 群でのみ検出された。全身のオートファゴソームが蛍光標識されるトランスジェニックマウスである GFP-LC3 マウスを用いて同様の実験を行うと、DOX + Cur 群では飢餓刺激を与えた陽性コントロール群と同程度のオートファジーの誘導が心筋において観察されたことから、Cur の心筋保護効果がオートファジーを介している可能性が示唆された。

次にラット新生仔心筋細胞を培養し DOX (1 μ M)、Cur (5 μ M) 及び DOX + Cur (各 1

μ M、5 μ M) の負荷を行った。GFP-LC3 発現アデノウイルスを感染させた心筋の観察では DOX + Cur 投与によりオートファジーが有意に誘導され、Westernblot 法においてもオートファゴソーム形成と正の相関を示す LC3-II タンパクが有意に発現増加し、DOX + Cur 投与によるオートファジーの誘導が確認された。TUNEL 染色では DOX による心筋アポトーシスが DOX + Cur 投与により抑制され、Westernblot 法では DOX 投与により増加した PARP の切断フラグメントが、DOX + Cur 投与により有意な減少を見た。オートファジー阻害剤の 3-メチルアデニン(3-MA)を投与すると、DOX + Cur 負荷時よりも TUNEL 陽性心筋細胞数が有意に増加し、Westernblot 法でも Cur による PARP の切断フラグメント発現抑制効果は打ち消された。オートファジーの役割をさらに評価するためマウス腹腔内にオートファジー阻害剤の Chloroquine を投与したところ、Chloroquine + DOX + Cur 群のマウスの死亡率は 86%に上り、DOX + Cur 群に比し心機能の有意な低下を認めた。癌細胞において高濃度の Cur はオートファジーを起こし、また細胞障害性に働くことから、このメカニズムはオートファジーとアポトーシスのクロストークに関連するのではないかと考えた。ストレス応答性 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の JNK に着目したところ、心筋細胞において DOX 投与早期から認められた JNK のリン酸化は、Cur の共投与により抑制されることが Westernblot 法で確認された。さらに JNK 阻害剤の SP600125 を GFP-LC3 のプラスミドを導入した心筋細胞に投与したところ、Cur による GFP-LC3 陽性のオートファゴソーム増加は減少し、SP600125 により Cur によるオートファジーの誘導が抑制されることが示された。Westernblot 法でも SP600125 投与で Cur 投与による LC3-II タンパク発現は有意に低下し、PARP の切断フラグメントの増加が見られた。

以上の結果から、Cur は JNK のリン酸化の制御を介したオートファジーの誘導により DOX 起因性心筋障害に対し保護的に働く事が示され、経口摂取可能な天然物質の Cur が DOX 起因性心筋障害を予防する手段となる可能性が示唆された。他の心筋ストレスに対しても Cur が心保護的に働くかどうか、今後のさらなる解明が必要と考えられた。